

**Untersuchungen zur Funktion und Biogenese  
der mitochondrialen Ribosomen  
in *Neurospora crassa***

**Peter Massinger**  
        

1970





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie  
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Th. Bücher

Untersuchungen zur Funktion und Biogenese der  
mitochondrialen Ribosomen in *Neurospora crassa*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

von

Peter Massinger

aus

München

München 1970



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

3. November 1970

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung                                                         | 1  |
| 2. Plan                                                               | 5  |
| 3. Methoden                                                           | 7  |
| 3.1. Züchten von <i>Neurospora crassa</i> -Hyphen                     | 7  |
| 3.2. Isolierung von Mitochondrien                                     | 8  |
| 3.2.1. Nach Aufschluß der Hyphen mit Quarzsand                        | 8  |
| 3.2.2. Nach Aufschluß der Hyphen mit der <i>Neurospora</i> -Zellmühle | 9  |
| 3.3. Isolierung und Gradientenzentrifugation von Ribosomen            | 10 |
| 3.3.1. Mitochondriale Ribosomen                                       | 10 |
| 3.3.2. Cytosolische Ribosomen                                         | 11 |
| 3.3.3. Analyse der Gradienten                                         | 11 |
| 3.4. Isolierung von RNA                                               | 12 |
| 3.4.1. Mitochondriale RNA                                             | 12 |
| 3.4.2. Cytosolische RNA                                               | 12 |
| 3.4.3. RNA aus <i>Escherichia coli</i>                                | 13 |
| 3.4.4. Cytosolische RNA aus <i>Locusta</i> -Flugmuskel                | 13 |
| 3.5. RNA-Gelelektrophorese                                            | 13 |
| 3.6. Einbau von radioaktiven Aminosäuren                              | 14 |
| 3.6.1. In vitro Einbau                                                | 14 |
| 3.6.2. In vivo Einbau                                                 | 15 |
| 3.7. Radioaktivitätsmessung                                           | 15 |
| 3.7.1. Ganze und lysierte Mitochondrien                               | 15 |
| 3.7.2. Ribosomen                                                      | 16 |
| 3.8. Proteinbestimmung                                                | 16 |
| 3.9. RNA-Bestimmung                                                   | 16 |

|                                                                                                        | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4. Ergebnisse                                                                                          | 17    |
| 4.1. Charakterisierung der mitochondrialen Ribosomen                                                   | 17    |
| 4.1.1. Gradientenzentrifugation von mitochondrialen<br>und cytosolischen Ribosomen                     | 17    |
| 4.1.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von mito-<br>chondrialer und cytosolischer ribosomaler<br>RNA | 19    |
| 4.2. Synthese von Peptidketten an Ribosomen in isolierten<br>Mitochondrien                             | 22    |
| 4.2.1. Synthese von Puromycin-ablösbaeren Peptid-<br>ketten                                            | 22    |
| 4.2.2. Inkubation markierter Ribosomen mit Ribonu-<br>clease                                           | 25    |
| 4.3. Biosynthese der mitochondrialen ribosomalen Proteine                                              | 27    |
| 5. Diskussion                                                                                          | 32    |
| 6. Zusammenfassung                                                                                     | 37    |
| 7. Abkürzungen                                                                                         | 38    |
| 8. Literaturverzeichnis                                                                                | 39    |

## 1. EINLEITUNG

Die Biogenese des Mitochondriums stellt ein außerordentlich komplexes, zeitlich und räumlich geordnetes Geschehen von Synthese, Transport und Zusammenfügung von Proteinen, Nucleinsäuren und Phospholipiden zu übermolekularen Strukturen dar.

Ein Teilproblem ist die Biosynthese der mitochondrialen Proteine. Es ist bekannt, daß zwei Systeme hierzu beitragen. Das eine ist außerhalb der Mitochondrien lokalisiert, nämlich das cytosolische System. Das andere befindet sich innerhalb der Mitochondrien.

Die Differenzierung zwischen diesen beiden Systemen richtet sich nach folgenden Fragestellungen aus:

- a) Welche Mechanismen liegen diesen beiden Systemen der Proteinbiosynthese zugrunde?
- b) Welches sind die Produkte dieser beiden Systeme, und was ist ihr quantitativer Beitrag zur Biogenese des Mitochondriums?
- c) Wie wird die Kooperation der beiden Systeme in der Zelle gesteuert?

Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit den unter a) und b) aufgeführten Problemen. Ihr zentrales Interesse gilt den mitochondrialen Ribosomen. Sie sind einerseits Bestandteil des biogenetischen Apparates der Mitochondrien, andererseits ist ihre eigene Biogenese ein wesentlicher Aspekt der Biogenese des ganzen Mitochondriums. Zum dritten kann man in ihnen ein Glied des Steuermechanismus der Mitochondrienbiogenese vermuten.

Die Isolierung von mitochondrialen Ribosomen wurde zum ersten Mal von KÜNTZEL und NOLL (1) und von RIFKIN et al. (2) für *Neurospora crassa* beschrieben. Andererseits lagen zahlreiche Ergebnisse über den Einbau von Aminosäuren in Mitochondrien in vivo und in vitro vor (eine zusammenfassende Darstellung siehe (3)). Dieser Einbau erfolgt in definierte, gelelektrophoretisch charakterisierte Proteinbanden der Innenmembran (4, 5). Es lag nahe, die

Funktion der mitochondrialen Ribosomen im Zusammenhang mit dem Einbau von Aminosäuren in Mitochondrien zu verstehen. Dieser Aspekt betrifft also die erste Fragestellung.

Die zweite Frage, nämlich die nach dem Produkt des mitochondrialen Aminosäureinbaus, ist bis jetzt nahezu vollkommen unbeantwortet. Nach Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Mitochondrien unter Bedingungen, unter denen nur das mitochondriale System aktiv ist, konnte bis jetzt mit proteinchemischen Methoden noch kein definiertes Produkt isoliert oder charakterisiert werden. Ein anderes Verfahren zur Auffindung mitochondrial synthetisierter Komponenten ist, in ihrer Funktion bekannte Proteine der Mitochondrien danach zu untersuchen, ob ihre Synthese dem äußeren oder inneren System unterworfen ist. In unserem Zusammenhang soll dieses Verfahren zur Beantwortung der Frage angewendet werden, welches System für die Biogenese der mitochondrialen Ribosomen verantwortlich ist. Dabei muß man unterscheiden zwischen der Biosynthese der ribosomalen RNA und der ribosomalen Proteine. Für die ribosomale RNA ist inzwischen bekannt, daß sie auf der mitochondrialen DNA codiert ist und innerhalb der Mitochondrien synthetisiert wird (6, 7, 8, 9). Das Interesse richtet sich daher auf den Ort der Biosynthese der mitochondrialen ribosomalen Proteine.

Die Bearbeitung dieser Probleme setzt voraus, daß die beiden Systeme unabhängig voneinander zu untersuchen sind. Da sie in der intakten Zelle, zumindest in obligaten Aerobiern, wie *Neurospora*, tatsächlich streng voneinander abhängig sind, ist eine solche Trennung jedoch nur begrenzt möglich. Ein Eingriff in das eine System wird stets das andere, wenn vielleicht auch mit einer gewissen zeitlichen Verschiebung, beeinflussen. In den letzten Jahren sind im wesentlichen drei methodische Möglichkeiten entwickelt worden, die eine solche Differenzierung erlauben:

- a) Die Untersuchung des Aminosäureinbaus in isolierte, gereinigte Mitochondrien. Dabei wird also das cytoplasmatische Proteinsynthesystem mechanisch entfernt. Dies ist die am längsten benützte Versuchsanordnung, mit der sehr viele Aussagen zur mitochondrialen Biogenese getroffen wurden. Ihr Vorteil liegt in ihrer Einfachheit und in dem streng kon-

trollierbaren Ausschluß des äußeren Systems. Ihr Nachteil ergibt sich aus der lange bekannten Tatsache, daß zahlreiche Funktionen in diesen isolierten Mitochondrien beeinträchtigt sind. Dazu gehören Transportprozesse über die mitochondrialen Membranen, die Aktivierung von Proteasen, Nucleasen und ATPasen verschiedensten Ursprungs, die mögliche Beeinträchtigung von Initiierung von Peptidketten und deren Ablösung von den Ribosomen und viele andere.

- b) Ein eleganteres Verfahren stellt die wechselseitige Ausschaltung des cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Aminosäureinebausystems durch spezifische Hemmstoffe in der intakten Zelle dar. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt ganz offensichtlich in der geringeren Gefahr, Zellfunktionen zu beeinträchtigen und damit Artefakte zu schaffen. Die klassischen Inhibitoren sind dazu Cycloheximid (10, 11) und Chloramphenicol (12, 13, 14), die die cytoplasmatische bzw. mitochondriale Proteinsynthese auf der Stufe der Peptidbildung blockieren.
- c) Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung stellt das Arbeiten mit Mutanten dar, insbesondere mit cytoplasmatischen Mutanten, also solchen, in denen die im Cytoplasma lokalisierte Information verändert ist. Die für unser Problem interessanten cytoplasmatischen Mutanten sind also solche der mitochondrialen DNA. Sie können darüber Auskunft geben, welche für die Biogenese der Mitochondrien essentiellen Informationen in der mitochondrialen DNA gespeichert sind und eventuell auch in den Mitochondrien realisiert werden. Diese cytoplasmatischen Mutanten stellen vor allem deswegen günstige Untersuchungsobjekte dar, als ihr Einsatz zur Differenzierung von mitochondrialem und extramitochondrialem Beitrag zur Biogenese des Mitochondriums einen so weitgehenden Eingriff in ihre zellulären Funktionen wie bei den beiden zuerst genannten Möglichkeiten erspart. Diese dritte Möglichkeit ist freilich auf wenige Organismen beschränkt, im wesentlichen auf Hefe und *Neurospora*. In anderen, insbesondere in höheren Organismen, sind Mutanten der mitochondrialen DNA entweder noch nicht bekannt oder nicht existent.

Je nach Fragestellung und nach experimentellen Möglichkeiten wird nun das eine oder das andere dieser drei Verfahren herangezogen werden. Die hier vorliegende Arbeit mit *Neurospora crassa* bedient sich der beiden ersten Verfahren und hat die Benützung der dritten, nämlich des Studiums der cytoplasmatischen Mutante *mi-1* (*poky*) von *Neurospora*, veranlaßt.

## 2. PLAN

Wie in der Einleitung dargelegt, sind die mitochondrialen Ribosomen für die mitochondriale Biogenese im wesentlichen aus zwei Gründen interessant:

Einerseits sind sie Bestandteil des mitochondrialen Proteinbiosyntheseapparates, zum anderen müssen sie selbst als Produkt des mitochondrialen Protein- und Nucleinsäuresynthesystems diskutiert werden.

Zur Verfolgung dieser beiden Aspekte war das Arbeiten mit sauberen mitochondrialen Ribosomen notwendig, die nicht durch cytosolische Ribosomen oder durch andere Zellbestandteile verunreinigt sein durften.

Als entsprechende Reinheitskriterien sollten daher das Verhalten der Ribosomen auf dem Dichtegradienten untersucht werden, sowie ihr Protein/RNA Verhältnis. Ein weiteres wichtiges Reinheitskriterium ist die Zusammensetzung der RNA dieser Ribosomen. Dies sollte mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese kontrolliert werden. Alle diese Untersuchungen an den mitochondrialen Ribosomen sollten im Vergleich mit den cytosolischen Ribosomen durchgeführt werden.

Mit diesen nach den vorliegenden Daten reinen mitochondrialen Ribosomen sollte dann die Hypothese überprüft werden, ob diese Ribosomen in den Mitochondrien Polypeptidketten synthetisieren. Diese Überprüfung ist durch Einsetzen von Puromycin möglich, das unfertige Ketten von Ribosomen ablöst. Auch kann man in einer derartigen Versuchsanordnung untersuchen, ob in Mitochondrien Polysomen existieren. Zugleich sollen diese Experimente darüber Auskunft geben, wie weit der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien den *in vivo* Prozeß widerspiegelt; d. h., ob in Mitochondrien tatsächlich ein effektives Proteinsynthesystem existiert, das fertige Polypeptidketten produziert und nicht nur zu einer Anheftung von Aminosäuren an Ribosomen führt.

Die zweite Frage, ob die mitochondrialen ribosomalen Proteine ein Produkt der eigenen Syntheseleistung darstellen oder ob sie von den cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden, sollte in einem *in vivo* Experiment entschieden werden,

in dem das mitochondriale und das cytosolische System wechselweise durch spezifische Hemmstoffe ausgeschaltet werden. Als Hemmstoffe wurden Cycloheximid und Chloramphenicol verwendet.

### 3. METHODEN

#### 3.1. Züchten von *Neurospora crassa* - Hyphen

Konidien suspensionen des Wildtyps 74 A von *Neurospora crassa* stellte SEBALD (15) freundlicherweise zur Verfügung. Die Hyphen wurden in Vogels Minimalmedium (16) - siehe unten - unter sterilen Bedingungen gezüchtet. In 10 l Kolben oder 200 ml Erlenmeyer-Kolben wurden jeweils 8 l bzw. 50 ml Medium mit Konidien beimpft (Endkonzentration  $2 \times 10^6$  Konidien pro ml). Die Erlenmeyer-Kolben wurden bei 25°C geschüttelt, die 10 l Kolben, in einem auf 25°C thermostatisierten Wasserbad, mit gereinigter steriler Luft kräftig belüftet. In der späten logarithmischen Phase (18 - 24 h nach Inokulation) wurden die Hyphen mit einer Ausbeute von ungefähr 1 g Feuchtgewicht pro 50 ml Medium geerntet.

#### Vogels Medium (50-fach konzentriert)

in 750 ml Aqua dest. werden bei Zimmertemperatur unter Rühren gelöst:

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ anhydr.   | 250 g  |
| tri-Natriumcitrat . $2 \text{ H}_2\text{O}$                  | 150 g  |
| Ammoniumnitrat, $\text{NH}_4\text{NO}_3$                     | 100 g  |
| Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 10 g   |
| Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  | 5 g    |
| dazu kommen:                                                 |        |
| Spurenelement-Lösung                                         | 5,0 ml |
| Biotin-Lösung                                                | 2,5 ml |

#### Spurenelement-Lösung

|                                                         |       |
|---------------------------------------------------------|-------|
| $\text{H}_2\text{O}$                                    | 95 ml |
| Zitronensäure . $1 \text{ H}_2\text{O}$                 | 5 g   |
| Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 5 g   |

|                                                                                             |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Ammoniumeisen-III-sulfat, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 1 g    |
| Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$                                    | 0,25 g |
| Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$                                    | 0,05 g |
| Borsäure, $\text{H}_3\text{BO}_3$                                                           | 0,05 g |
| Natriummolybdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$                       | 0,05 g |

### Biotin-Lösung

5 mg Biotin werden in 50 ml 50 %igem Äthanol gelöst.

### Vogels Minimalmedium

|                                                          |         |
|----------------------------------------------------------|---------|
| Vogels Medium (50-fach konzentriert), filtersterilisiert | 20 ml/l |
| 50 %ige Saccharoselösung, autoklaviert                   | 40 ml/l |

## 3.2. Isolierung von Mitochondrien

Aus den Hyphen von *Neurospora crassa* wurden die Mitochondrien nach zwei Methoden isoliert:

### 3.2.1. Nach Aufschluß der Hyphen mit Quarzsand

Die Hyphen wurden auf einer Nutsche abgesaugt und mit eiskaltem Isolierungsmedium (IM) gewaschen. Nach einer Modifikation der Methode von LUCK (17) wurden die Hyphen bei  $+4^\circ\text{C}$  in einer Porzellanreibschale mit der dreifachen Menge (Volumen pro Feuchtgewicht) IM und 0,7 g Quarzsand pro g Hyphenfeuchtgewicht 8 min gerieben. Diese Suspension, mit drei weiteren Volumenteilen des IM verdünnt, wurde durch ein engmaschiges Leinentuch gepreßt. Der Rückstand wurde unter Zusatz der gleichen Menge IM 5 min im Mörser gerieben; erneute Verdünnung mit drei Volumenteilen IM und danach Abpressen im Leinentuch. Die so erhaltenen beiden Filtrate wurden vereinigt und folgendem Zentrifugationsgang unterworfen: 10 min bei 1.500xg, der Überstand 30 min bei 11.000xg. Das nun erhaltene Sediment wur-

de resuspendiert, dann 10 min bei 550xg abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde 20 min bei 17.300xg zentrifugiert. Das dabei erhaltene Pellet wurde erneut resuspendiert und bei 17.300xg 20 min zentrifugiert. Das nun gewonnene Mitochondrienpellet konnte für die *in vitro* Versuche verwendet werden. Alle Schritte erfolgten bei  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Um hochgereinigte Mitochondrien zu erhalten, wurden die auf die bisher beschriebene Art gewonnenen Mitochondrien über einen linearen Saccharosegradienten geschickt. Saccharosekonzentration des Gradienten: 25 % - 68 % (m/v). Die Saccharose war in  $\text{AMT}_{10}$  gelöst. Zentrifugation 1 h 75.500xg bei  $+1^{\circ}\text{C}$  in einem Spinco Rotor SW 25/2. Die Mitochondrien wanderten als deutlich abgrenzbare Bande in das untere Drittel des Zentrifugenbechers und wurden durch Fraktionierung des Gradienten abgetrennt. Die erhaltene Suspension wurde auf eine Saccharosekonzentration von 0,44 M mit  $\text{AMT}_{10}$  verdünnt. Durch eine anschließende Zentrifugation von 20 min bei 17.300xg wurden dann die Mitochondrien sedimentiert.

### 3.2.2. Nach Aufschluß der Hyphen mit der Neurospora-Zellmühle

Die wie unter 3.1. gewonnenen Hyphen wurden in 10 Volumenteilen des IM aufgenommen. Diese Suspension wurde 1 min im Braun-Mixer homogenisiert. Die so erhaltene feine Suspension wurde der Behandlung durch die von WEISS et al. (18) angegebene Zellmühle zum Aufschluß der Hyphen unterworfen. Aus der die Mühle verlassenden Suspension wurden die Mitochondrien durch den gleichen Zentrifugationsgang, wie oben beschrieben, gewonnen. Wieder erfolgten alle Schritte bei  $+4^{\circ}\text{C}$  (Zellmühle im Kühlraum).

Der Vorteil der zweiten Methode liegt darin, daß die Hyphen unter standardisierten Bedingungen aufgeschlossen werden. Weiterhin entfällt die bei der Methode 3.2.1. gegebene - wenn auch sehr geringe - Verunreinigung mit feinsten Quarzsandpartikelchen. Die Intaktheit der durch die zweite Methode gewonnenen Mitochondrien wurde durch WEISS et al. (18) nachgewiesen.

### 3.3. Isolierung und Gradientenzentrifugation von Ribosomen

#### 3.3.1. Mitochondriale Ribosomen

Mitochondriale Ribosomen wurden nach den Methoden von KÜNTZEL und NOLL (1) sowie RIFKIN et al. (2) isoliert. Zum Lysieren wurden die Mitochondrien (60 - 100 mg Protein) in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator mit Teflonstempel in 44 ml  $\text{AMT}_{10}$  aufgenommen und nach Zusatz von Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) 5 min im Eisbad homogenisiert. Das dabei entstandene Lysat wurde einer Reinigungszentrifugation von 30 min bei 30.000xg unterzogen. Aus dem klaren Überstand konnten die Ribosomen durch eine dreistündige Zentrifugation im Spinco Rotor 50 Ti bei 150.000xg sedimentiert werden. Das gelbliche honigartige Pellet wurde durch vorsichtiges Schwenken in  $\text{AMT}_{30}$  suspendiert. Die Ribosomen erwiesen sich gegen jegliche mechanische Belastung als äußerst empfindlich. Außerdem wurde besonders darauf geachtet, daß der pH-Wert nicht abfiel. Deshalb wurde ein Puffer mit 30 mM Tris-HCl verwendet. Die so gewaschenen Ribosomen wurden wieder bei 150.000xg 3h abzentrifugiert. Die dabei erhaltenen Ribosomen wurden in 200 - 300  $\mu\text{l}$   $\text{AMT}_{30}$  wieder durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde diese Suspension durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge Eppendorf (10 sec) von eventuellen Verunreinigungen befreit. Vom Überstand wurden 10  $\mu\text{l}$  in einer Verdünnung 1 : 100 benutzt, um das Absorptionsspektrum (220 nm bis 320 nm) zu schreiben. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm betrug 1,8 : 1. Die weitere Auftrennung der Ribosomen erfolgte über einen isokinetischen konvexen Saccharosedichtegradienten, wie von NOLL (19) angegeben: Volumen 12 ml, 9,6 ml vorgelegte Saccharoselösung 15 %ig (m/v), Konzentration der Saccharoselösung im Reservoir 30,5 % (m/v). Die Saccharose war jeweils in  $\text{AMT}_{10}$  gelöst. Auf einen Gradienten wurden maximal 10  $A_{260}$ -Einheiten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im Spinco Rotor SW 41 bei 286.000xg 2 h lang bei +1°C.

### 3.3.2. Cytosolische Ribosomen

Zur Gewinnung cytosolischer Ribosomen wurden die Hyphen in einem  $Mg^{++}$ -haltigen Medium aufgeschlossen. Das Isolierungsmedium enthielt in diesem Fall 0,44 M Saccharose, 1 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,2. Die Hyphen wurden nach einer der oben beschriebenen Methoden aufgeschlossen. Die Suspension der aufgeschlossenen Hyphen wurde dann 20 min bei 17.300xg, der daraus resultierende Überstand 20 min bei 27.000xg zentrifugiert. Diese beiden Schritte sedimentierten sowohl Zelltrümmer als auch Mitochondrien. Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde mit Triton X-100 (Endkonzentration 0,5 %) versetzt. Das Lysat wurde 20 min bei 27.000xg, der daraus resultierende Überstand 2 h im Spinco Rotor 30 bei 78.500xg zentrifugiert. Die dabei entstandenen glasklaren Ribosomenpellets wurden in  $AMT_{30}$  suspendiert und erneut 2 h bei 78.500xg abzentrifugiert. Von den gereinigten Ribosomen wurde dann das Absorptionsspektrum registriert und maximal 10  $A_{260}$ -Einheiten auf einen wie oben beschriebenen Saccharosedichtegradienten aufgetragen.

Sowohl cytosolische als auch mitochondriale Ribosomen wurden bei Bedarf als Pellets bei  $-70^{\circ}C$  aufbewahrt.

### 3.3.3. Analyse der Gradienten

Nach der Zentrifugation wurden die Zentrifugenbecher am Boden mit einer Kanüle angestochen. Der Auslauf wurde in 40 Fraktionen zu je 0,3 ml zerlegt. Die Fraktionen wurden mit  $AMT_{10}$  auf 1,0 ml verdünnt. In den einzelnen Fraktionen wurde dann jeweils die Absorption bei 260 nm und 280 nm registriert, gegebenenfalls der Proteingehalt sowie die Radioaktivität bestimmt.

### 3.4. Isolierung von RNA

#### 3.4.1. Mitochondriale RNA

Die mitochondriale ribosomale RNA wurde nach der von RIFKIN et al. (2) beschriebenen Methode isoliert. Die Mitochondrien wurden nach einer der beiden oben dargestellten Methoden gewonnen; die Reinigung der Mitochondrien durch den linearen Saccharosedichtegradienten wurde bei dieser Prozedur jedoch weggelassen. Die Mitochondrien wurden im eiskalten IM resuspendiert und mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt (Endkonzentration von SDS 2 %) und damit lysiert. Innerhalb von 1 bis 2 sec nach Zugabe von SDS wurde das Lysat in 4 ml-Anteilen mit dem gleichen Volumen Phenolwasser (80 % Phenol, 20 % Wasser) versetzt, dem ca. 1 g Macaloid/10 ml zugesetzt war. Die Gemische wurden in 12 ml-Zentrifugenbechern (Pyrex) 10 min mechanisch kräftig geschüttelt. Danach wurde im Eisbad abgekühlt und 10 min bei 7.700xg bei +4°C zentrifugiert. Die resultierende obere wäßrige Phase wurde gesammelt und auf gleiche Weise noch zweimal mit Phenolwasser/Macaloid ausgeschüttelt. Aus der letzten wäßrigen Phase wurde das Phenol durch fünfmaliges Extrahieren mit gleichen Volumina Äther (peroxidfrei) entfernt. Schließlich wurde die RNA durch Zusatz von zwei Volumina absoluten Äthanol bei -20°C ausgefällt und abzentrifugiert. Die getrockneten RNA-Pellets wurden in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,2 aufgenommen. Der RNA-Gehalt der resultierenden Lösungen wurde aus der Absorption bei 260 nm bestimmt. Danach wurde die Lösung auf eine RNA-Konzentration von 25 A<sub>260</sub>-Einheiten/ml sowie auf eine Saccharose-Konzentration von 8 % eingestellt und mit einer Spur Bromphenolblau angefärbt. Die RNA-Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.4.2. Cytosolische RNA

Die Isolierung cytosolischer RNA erfolgte aus Hyphen, die in einem kleinen Volumen 1 %iger NaCl-Lösung aufgeschlossen wurden (10 g Hyphen + 7 g Quarzsand + 10 ml NaCl-Lösung wurden 8 min in der Reibschale bearbeitet). Das Homogenat wurde durch ein feinmaschiges Leinentuch gepreßt und dadurch von größeren Zell-

trümmern befreit. Das so gewonnene Homogenat wurde einer Zentrifugation von 20 min bei 27.000xg unterzogen. Der Überstand wurde, wie oben beschrieben, phenolisiert, die RNA mit Äthanol gefällt und das RNA-Pellet, wie oben beschrieben, gelöst.

### 3.4.3. RNA aus *Escherichia coli*

Ribosomen von *Escherichia coli* (freundlicherweise von Herrn Prof. ZILLIG zur Verfügung gestellt) wurden in folgendem Puffer suspendiert: 22 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM Magnesiumacetat, 2,5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10 mM Mercapto-äthanol, pH 7,3. Aus dieser Suspension wurde die ribosomale RNA durch Phenolisieren, wie oben beschrieben, isoliert.

### 3.4.4. Cytosolische RNA aus *Locusta* - Flugmuskel

Cytosolische RNA aus dem Flugmuskel von *Locusta migratoria* wurde von Dr. W. KLEINOW freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## 3.5. RNA-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte nach der Methode von DINGMAN und PEACOCK (20, 21). Die RNA-Lösung wurde in einer Flachkammer auf ein 2,7 %iges Polyacrylamidgel, das durch 0,5 % Agarose verstärkt war, aufgetragen. Als Puffer fand Tris-Borat vom pH 8,3 mit 2,5 mM EDTA Verwendung. Nach 2 - 3 h bei 200 - 240 V wurden die Gele nach Ansäuern mit 1 M Essigsäure mit Toluidinblau angefärbt. Die Gele wurden nach Auswaschen des nicht an RNA gebundenen Toluidinblaus bei 546 nm densitometriert. Dies erfolgte in einem eigens für diesen Zweck umgebauten Eppendorf-Photometer mit Punktblende. Zur Dokumentation wurden auch die ganzen Gele im durchscheinenden Licht fotografiert.

### 3.6. Einbau von radioaktiven Aminosäuren

#### 3.6.1. In vitro Einbau

Der *in vitro* Einbau von radioaktiven Aminosäuren wurde an Mitochondrien vorgenommen, bevor diese der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen wurden. Die Mitochondrien (60 - 100 mg Protein) wurden in einem für den Einbau von Aminosäuren optimalen Medium, das von SEBALD et al. (22) angegeben wurde, suspendiert: 0,15 M Saccharose, 30 mM KCl, 30 mM TRA-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM  $MgCl_2$ , 20 mM  $KH_2PO_4$ , 4 mM ATP, 0,3 mg/ml Aminosäure-Gemisch (ohne Leucin, Isoleucin und Phenylalanin), pH 7,6. Zusammensetzung des Aminosäuregemisches in molaren Verhältnissen: Alanin 1,0; Arginin 0,5; Asparaginsäure 0,75; Asparagin 0,25; Cystin 0,25; Histidin 0,25; Lysin 0,75; Glycin 0,75; Methionin 0,25; Prolin 0,25; Serin 0,5; Threonin 0,5; Tryptophan 0,25; Tyrosin 0,25; Valin 0,5. Das Endvolumen betrug 60 ml. Nach Zugabe von l-(U-14C)-Leucin (311 mC/mMol), l-(U-14C)-Isoleucin (308 mC/mMol) und l-(U-14C)-Phenylalanin (459 mC/mMol) ("The Radiochemical Centre, Amersham, England"), jeweils 6  $\mu$ C, wurde in 1 ml-Anteile 20 min bei +30°C unter Schütteln inkubiert. Der erste Anteil, der das Kontrollexperiment darstellte, wurde am Ende der Einbauzeit unmittelbar durch Abkühlung auf 0°C gestoppt. Der zweite Anteil (Puromycinexperiment) wurde nach Zusatz von 0,4 mM Puromycinhydrochlorid unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert und dann ebenfalls auf 0°C abgekühlt.

Dann wurden die beiden Anteile gleich behandelt. Zuerst erfolgte eine Zentrifugation 20 min bei 17.300xg; die sedimentierten Mitochondrien wurden in IM resuspendiert, das 5 mM von jeweils unmarkiertem l-Leucin, l-Isoleucin und l-Phenylalanin enthielt. Diese Suspension wurde wiederum 20 min bei 17.300xg zentrifugiert. Zur weiteren Reinigung wurden die Mitochondrien in IM suspendiert und in dem oben beschriebenen 25 - 68 %igen Saccharosedichtegradienten gereinigt. Aus den so gereinigten Mitochondrien wurden die Ribosomen, wie oben beschrieben, isoliert und über den isokinetischen Dichtegradienten zentrifugiert.

### 3.6.2. In vivo Einbau

*Neurospora crassa*-Hyphen wurden, wie oben beschrieben, in 50 ml-Volumina für 18 h gezüchtet. Jeweils 25 Kolben wurden mit den drei oben genannten radioaktiv markierten Aminosäuren (jeweils 6,7 nC/ml Zuchtmedium) versetzt. Nach 20 min wurden die gleichen Aminosäuren in unmarkierter Form in einer Endkonzentration von jeweils 2 mM zugegeben. Dieser "Chase" dauerte weitere 20 min. Dann wurden die Hyphen geerntet, mit 500 ml IM, das die drei Aminosäuren (jeweils 5 mM) in unmarkierter Form enthielt, gewaschen. Daraus wurden dann die Mitochondrien und mitochondrialen Ribosomen isoliert. Bei den Hemmexperimenten wurde vor Zugabe der radioaktiven Aminosäuren mit dem jeweiligen Hemmstoff 10 min vorinkubiert. Konzentration der Hemmstoffe: Cycloheximid 0,1 mg/ml; D-Chloramphenicol 4 mg/ml.

### 3.7. Radioaktivitätsmessung

#### 3.7.1. Ganze und lysierte Mitochondrien

Aliquoten der Mitochondriensuspension oder der Suspension der lysierten Mitochondrien wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit TCA gefällt (TCA-Endkonzentration 5 %). Der abzentrifugierte Niederschlag wurde dann dreimal mit kalter TCA gewaschen. Dann wurde der Niederschlag in 5 %iger TCA 10 min bei +90°C im Wasserbad gehalten (nicht im *in vitro* Experiment). Es folgte dann zweimaliges Waschen mit kalter TCA, dann mit Äther-Äthanol-Gemisch (Äther: Äthanol 1:3, v/v), schließlich mit Äther. Nach völligem Trocknen wurde das gefällte Protein in Ameisensäure gelöst. Die Lösung wurde auf Aluminiumplättchen gebracht, die Ameisensäure unter Infrarotbestrahlung verdunstet. Die Radioaktivität wurde nun im Methan-Durchflußzähler FH 47 (Fa. FRIESEKE-HOEPFNER) bestimmt.

### 3.7.2. Ribosomen

Aliquoten der Ribosomensuspension und der Gradientenfraktionen wurden unmittelbar auf mit RBS abgeriebene Aluminiumplättchen aufgetragen und das Wasser unter Infrarotbestrahlung verdunstet. Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte wiederum im Methan-Durchflußzähler. Da die verschiedenen Fraktionen des Gradienten verschiedene Mengen an Saccharose enthielten, wurde der jeweilige Selbstabsorptionskoeffizient ermittelt und die Werte auf die Selbstabsorption Null extrapoliert.

Die Zählausbeute im Methan-Durchflußzähler betrug etwa 40 %.

### 3.8. Proteinbestimmung

Mitochondrienprotein wurde nach der Biuretmethode von BEISENHERZ et al. (23) in einer Modifikation bestimmt. Die Proteingehalte der einzelnen Fraktionen des Gradienten und der Ribosomensuspensionen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (24) ermittelt.

### 3.9. RNA-Bestimmung

Zur RNA-Bestimmung wurden Aliquoten von jeder Fraktion mit kalter Perchlorsäure (Endkonzentration 5 %) gefällt, viermal mit kalter 5 %iger  $\text{HClO}_4$  gewaschen und mit 5 %iger  $\text{HClO}_4$  durch 15-minütiges Erhitzen auf  $+90^\circ\text{C}$  hydrolysiert. Im Überstand der darauf folgenden Zentrifugation wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Hochmolekulare RNA von Hefe (SERVA) wurde als Standard verwendet.

Diese Methode ergab übereinstimmende Werte, die nach der Orcin-Methode (25) gefunden wurden.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Charakterisierung der mitochondrialen Ribosomen

#### 4.1.1. Gradientenzentrifugation von mitochondrialen und cytosolischen Ribosomen

Zu einer vergleichenden Untersuchung ihres Sedimentationsverhaltens wurden mitochondriale und cytosolische Ribosomen einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen.

Die Isolierung der mitochondrialen Ribosomen erfolgte aus gradientengereinigten Mitochondrien durch Lysieren mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100.

Aus dem Lysat wurden die Ribosomen durch Zentrifugation niedergeschlagen.

Die cytosolischen Ribosomen wurden nach Aufschluß der Zellen in einem  $Mg^{++}$ -haltigen Medium gewonnen. Aus dem Überstand der Mitochondrienfraktion konnten keine intakten cytosolischen Ribosomen isoliert werden, da das im Isolierungsmedium für Mitochondrien enthaltene EDTA eine Aggregation der cytosolischen Ribosomen verursachte. Auch dem Isolierungsmedium der cytosolischen Ribosomen wurde Triton X-100 zugesetzt, um die ansonsten mit den cytosolischen Ribosomen sedimentierenden Vesikel zu beseitigen.

Wenn Ribosomen beiden Typs auf isokinetischen konvexen Saccharosedichtegradienten zentrifugiert wurden, die anschließend fraktioniert und nach optischer Dichte bei 260 nm und 280 nm analysiert wurden, ergaben sich folgende Bilder (Abbildung 1):

Im Falle der cytosolischen Ribosomen (unterer Teil der Abbildung 1) wurde ein starker Gipfel bei Fraktion 25 erhalten, der den cytosolischen Monomeren entspricht. Näher dem Boden des Zentrifugenbeckers fanden sich drei weitere kleinere Gipfel, die cytosolischen Polymeren zugeordnet werden konnten: Ein Dimeres bei Fraktion 18, ein Trimeres bei Fraktion 12 und ein Tetrameres bei Fraktion 6.

Oberhalb des Monomerengipfels fanden sich keine weiteren ribosomalen Partikel, d. h., in derart gewonnenen cytosolischen Ribosomen sind keine freien ribosomalen Untereinheiten anwesend. Das Verhältnis 1,9/1 von  $A_{260}/A_{280}$  in dem Monomerengipfel läßt auf sehr saubere Ribosomen schließen.

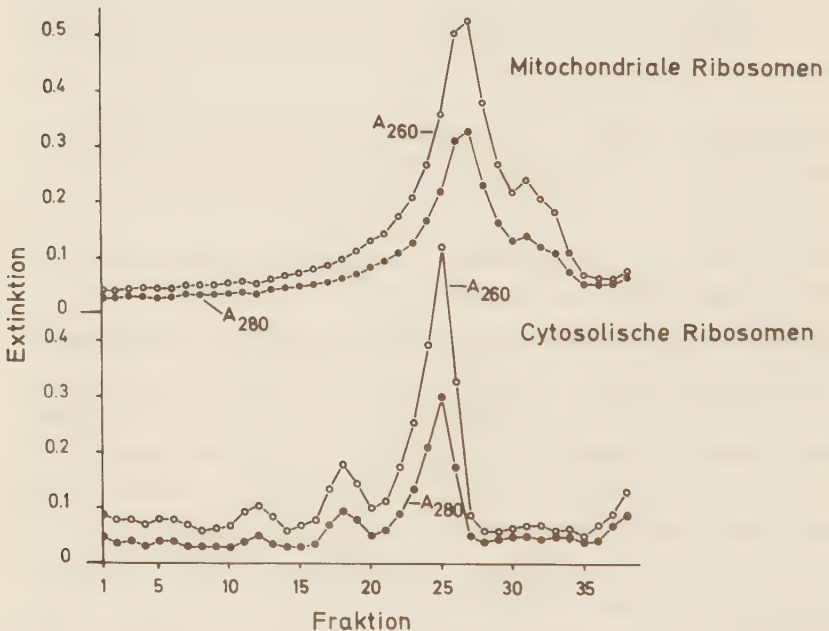


Abbildung 1: Auftrennung von mitochondrialen und cytosolischen Ribosomen aus *Neurospora crassa* über einen Saccharosedichtegradienten.

Mitochondriale und cytosolische Ribosomen wurden aus 18 h alten Hyphen von *Neurospora crassa* isoliert. Die Gradientenzentrifugation erfolgte im Spinco Rotor SW 41 2 h bei 286.000xg über einen konvexen Saccharosegradienten nach NOLL (19). Der Gradient wurde in Fraktionen zerlegt und in diesen die Absorption bei 260 nm und 280 nm registriert.

Der Verlauf der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm im Gradienten der mitochondrialen Ribosomen (oberer Teil der Abbildung 1) zeigt ebenfalls einen prominenten Gipfel, der ca. zwei Fraktionen vor dem der cytosolischen Monomeren

liegt, nämlich bei Fraktion 27. Dieser Gipfel kann den mitochondrialen Monomeren zugeordnet werden. Der Unterschied in der Wanderungsstrecke von cytosolischen und mitochondrialen Monomeren ist zwar gering, aber signifikant, denn er konnte bei zahlreichen Gradientenzentrifugationen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den cytosolischen Ribosomen fanden sich näher dem Boden des Zentrifugenbeckers keine weiteren Gipfel, die einen größeren Prozentsatz an Polysomen anzeigen würden. Weiterhin im Unterschied zu den cytosolischen Ribosomen ergab sich stets oberhalb des Monomerengipfels ein weiterer kleinerer Gipfel mit einer Schulter zur Auftragsstelle hin. Diese entsprechen, gemäß ihrer Wanderungsstrecke, den großen und kleinen mitochondrialen ribosomalen Untereinheiten. Das Verhältnis von Menge an Monomeren zur Menge an freien Untereinheiten war jedoch nicht konstant. Die Untersuchung einer größeren Anzahl von *Neurospora crassa*-Hyphen in verschiedenen Phasen des Wachstums führte zu dem Schluß, daß der mengenmäßige Anteil der freien Untereinheiten an den gesamten ribosomalen Partikeln mit zunehmendem Alter der Hyphen ansteigt. Bei Ribosomen aus 44 h gewachsenen Hyphen, die sich weit in der stationären Phase befanden, war das Verhältnis Monomeren zu großer und kleiner Untereinheit etwa gleich groß. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ist mit 1,6/1 kleiner als das bei den cytosolischen Ribosomen und offenbart einen höheren Gehalt an Protein in diesen mitochondrialen Ribosomen.

#### 4.1.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von mitochondrialer und cytosolischer ribosomaler RNA

Zur weiteren Charakterisierung und Abgrenzung der mitochondrialen Ribosomen gegen die cytosolischen Ribosomen wurde ihre RNA einer Analyse mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen.

Die RNA der mitochondrialen Ribosomen wurde durch Lysieren und Phenolisieren von Mitochondrien gewonnen, bei deren Isolierung der Dichtegradientenschritt ausgelassen worden war. Dies war erforderlich, da die Dichtegradientenzentrifugation der Mitochondrien eine partielle Hydrolyse der in ihnen enthaltenen RNA zur

Folge hatte. Die RNA aus den cytosolischen Ribosomen wurde aus mit 1 %igem NaCl aufgeschlossenen Hyphen gewonnen.

|        |          |              |        |
|--------|----------|--------------|--------|
| E.coli | N.crassa | L.migratoria | E.coli |
|        | M        | M+C          | C      |

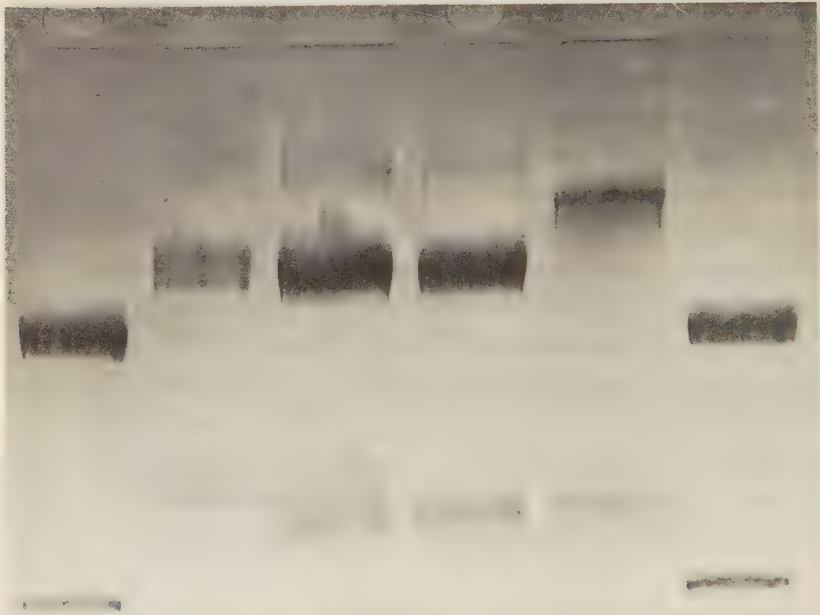


Abbildung 2: Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA.

RNA wurde aus *E. coli* Ribosomen, Mitochondrien (M) und dem 27.000xg Überstand (C) von *Neurospora crassa*-Hyphen sowie aus dem Cytosol des Flugmuskels von *Locusta migratoria* isoliert. Die Elektrophorese wurde nach einer Modifikation der Methode von DINGMAN und PEACOCK (20, 21) in einem 2,7 %igen Polyacrylamidgel (verstärkt mit 0,5 % Agarose) ausgeführt. Die Gele wurden mit Toluidinblau angefärbt und photographiert.

In Abbildung 2 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA aus beiden Typen von Ribosomen dargestellt. Als Vergleichssubstanz zur Identifizierung der Molekulargewichte wurden die in ihrer Größe bekannten ribosomalen RNAs von

*Escherichia coli* und vom Cytosol des Flugmuskels von *Locusta migratoria* auf dem selben Gel aufgetrennt.

Sowohl die RNA aus den cytosolischen Ribosomen (Abbildung 2: C) wie auch aus den mitochondrialen Ribosomen (Abbildung 2: M) werden jeweils in zwei Banden aufgetrennt. Dabei zeigen die weniger weit wandernden RNA-Spezies, also diejenigen der großen Untereinheiten, bei beiden Ribosomentypen genau die gleiche gelelektrophoretische Beweglichkeit. Die weiter wandernde, also der kleineren Untereinheit entsprechende RNA-Spezies der mitochondrialen Ribosomen wies eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit auf als die entsprechende der cytosolischen Ribosomen. Bei der Auftrennung eines Gemisches von RNA aus den beiden Ribosomentypen (Abbildung 2: M + C) beobachtet man dementsprechend drei Banden.

Aus dem Vergleich mit den RNA-Spezies aus *E. coli*- und *Locusta*-Ribosomen ließen sich für die ribosomalen RNAs aus *Neurospora* folgende Molekulargewichte berechnen:

**Mitochondriale Ribosomen:**

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| RNA der großen Untereinheit  | $1,28 \cdot 10^6$ |
| RNA der kleinen Untereinheit | $0,72 \cdot 10^6$ |

**Cytosolische Ribosomen:**

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| RNA der großen Untereinheit  | $1,28 \cdot 10^6$ |
| RNA der kleinen Untereinheit | $0,67 \cdot 10^6$ |

Es sei ferner darauf hingewiesen, daß aus den mitochondrialen Ribosomen von *Neurospora crassa* nie eine 5S RNA isoliert werden konnte, im Gegensatz zu den cytosolischen Ribosomen aus *Neurospora* und *Locusta migratoria* sowie aus *E. coli*-Ribosomen.

## 4.2. Synthese von Peptidketten an Ribosomen in isolierten Mitochondrien

### 4.2.1. Synthese von Puromycin-ablösbaren Peptidketten

Mitochondrien wurden vor Reinigung auf dem Saccharosedichtegradienten in einem Medium, dessen Zusammensetzung nach SEBALD et al. (22) für den Einbau von Aminosäuren als optimal beschrieben wurde, mit radioaktivem Leucin, Isoleucin und Phenylalanin inkubiert. Nach 20 min Inkubation wurde der Ansatz in zwei gleiche Anteile geteilt, wovon einer unmittelbar auf 0°C abgekühlt und damit die Reaktion gestoppt wurde (Kontrolle). Die andere Hälfte wurde nach Zusatz von 0,4 mM Puromycin weitere 7 min unter gleichen Bedingungen weiterinkubiert. Dann wurde auch dieser Anteil auf 0°C abgekühlt. Von diesem Punkt an wurden beide Anteile getrennt, aber identisch behandelt. Aus den Mitochondrien wurden nach Dichtegradientenreinigung durch Lysieren die Ribosomen isoliert. Die gesamten eingebauten Radioaktivitäten und die jeweiligen spezifischen Radioaktivitäten wurden in den einzelnen Stufen der Präparation bestimmt und sind in Tabelle 1 dargestellt:

In dem Kontrollexperiment (Tabelle 1, linke Seite) beträgt die in die Ribosomen eingebaute Radioaktivität weniger als 10 % der gesamten eingebauten Radioaktivität der lysierten Mitochondrien. Die spezifische Radioaktivität der rohen Ribosomenfraktion hingegen ist etwa 2,5 x so hoch wie die des Mitochondrienlysats.

Die Nachinkubation mit Puromycin (Tabelle 1, rechte Seite) bewirkte eine Abnahme der spezifischen Radioaktivität der rohen Ribosomenfraktionen um einen Faktor von etwa 4 verglichen mit der Kontrollfraktion. Die Abnahme der gesamten eingebauten Radioaktivität in dieser Fraktion ist sogar noch größer. Ebenso sinken die gesamten und spezifischen Radioaktivitäten der ganzen Mitochondrien. Dies kann wenigstens teilweise auf den Verlust von kleineren Peptidketten zurückgeführt werden, die durch Puromycin abgelöst werden. Möglicherweise werden diese kurzen Ketten nicht durch Trichloressigsäure niedergeschlagen, wenn die Proteinproben zur Radioaktivitätszählung aufbereitet werden. Die spezifischen und gesamten Radioaktivitäten in dem mitochondrialen Lysat nach Abzentrifugation der Ribosomen sinken nach Puromycingabe jedoch nicht, sondern steigen noch an.

Tabelle 1

| Fraktion                                              | Kontrollexperiment            |                | Puromycinexperiment           |                |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
|                                                       | Radioaktivität:               |                | Radioaktivität:               |                |
|                                                       | spezifische<br>cpm/mg Protein | gesamte<br>cpm | spezifische<br>cpm/mg Protein | gesamte<br>cpm |
| Mitochondrien<br>(nach Inkubation)                    | 7.000                         | 525.000        | 4.900                         | 343.000        |
| Lysierte<br>Mitochondrien                             | 7.210                         | 392.000        | 4.960                         | 238.000        |
| Sediment der lys.<br>Mitochondrien<br>30 min 30.000xg | 7.920                         | 13.050         | 3.650                         | 6.930          |
| Rohe mitochon-<br>driale Ribosomen                    | 17.660                        | 33.500         | 4.160                         | 5.830          |
| Überstand nach<br>Sedimentation<br>der Ribosomen      | 6.185                         | 180.700        | 7.110                         | 242.000        |

Tabelle 1: Spezifische Radioaktivitäten von verschiedenen mitochondrialen Fraktionen nach dem Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in isolierte Mitochondrien von *Neurospora crassa*.

Isolierte Mitochondrien wurden in einem von SEBALD et al. (22) beschriebenen Medium 20 min mit  $^{14}\text{C}$ -l-Leucin,  $^{14}\text{C}$ -l-Isoleucin und  $^{14}\text{C}$ -l-Phenylalanin (jeweils  $0,1 \mu\text{C}/\text{ml}$ ) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mitochondriensuspension halbiert. Die eine Hälfte wurde sofort auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt (Kontrollexperiment), die andere Hälfte wurde nach Zusatz von Puromycin (Endkonzentration  $0,4 \text{ mM}$ ) weitere 7 min inkubiert. Dann wurde auch dieser Anteil abgekühlt. In parallelen Arbeitsgängen wurden aus beiden Anteilen die mitochondrialen Ribosomen isoliert.

Die Ergebnisse stellen sich eindeutiger dar, wenn die rohen Ribosomenfraktionen weiter über einen Saccharosedichtegradienten gereinigt werden. Dies ist in Abbildung 3 dargestellt.

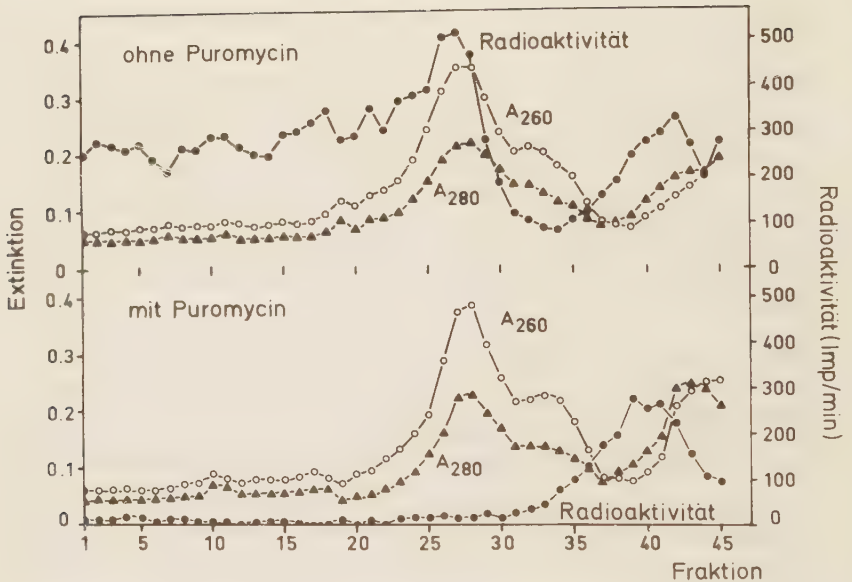


Abbildung 3: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Ribosomen aus *in vitro* markierten Mitochondrien ohne und mit auf den Einbau folgenden Zusatz von Puromycin.

Die rohen Ribosomen (Tabelle 1) wurden der Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterworfen. Die Gradienten wurden in einzelne Fraktionen zerlegt, deren Absorption bei 260 nm und 280 nm und die Radioaktivität gemessen.

In der Kontrollpräparation (Abbildung 3, oberer Teil) fand sich der größte Teil der eingebauten Radioaktivität in der Polymeren- (Fraktionen 1 - 23) und in der Monomerenregion (Fraktionen 24 - 30). Die Polysomen haben dabei eine weit höhere spezifische Radioaktivität als die Monosomen. Ein kleinerer Teil der Radioaktivität findet sich nahe dem Auftrag des Gradienten (Fraktionen 40 - 45). Dies ist eine Region, in der die Absorption bei 280 nm höher ist als bei 260 nm.

Nach Inkubation mit Puromycin (Abbildung 3, unterer Teil) ist keine Radioaktivität mehr an den Polysomen und den Monosomen zu finden. Nur das verunreinigende Protein nahe dem Auftrag des Gradienten behält seine Radioaktivität bei.

#### 4.2.2. Inkubation markierter Ribosomen mit Ribonuclease

Der weitere Nachweis, daß die in den Fraktionen unterhalb des Monosomengipfels befindliche Radioaktivität an Polysomen gebunden ist, läßt sich mit Hilfe der Einwirkung von RNase auf die mit radioaktiven Peptidketten beladenen Ribosomen erbringen.

Isolierte Mitochondrien wurden wie im vorhergehenden Experiment mit radioaktivem Leucin, Isoleucin und Phenylalanin markiert und die Ribosomen daraus isoliert. Die Fraktion der rohen Ribosomen wurde in zwei Hälften geteilt. Ein Teil wurde 60 min bei 0°C mit 1 µg/ml Pancreasribonuclease inkubiert (26), dann wurden beide Anteile auf Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Das Ergebnis dieser Zentrifugation ist in Abbildung 4 dargestellt.

In der Kontrollpräparation (Abbildung 4, unterer Teil) findet sich wieder ein Radioaktivitätsgipfel über dem Monosomengipfel und ein großer Teil der Radioaktivität in der Polysomenregion. Dieser Teil der Radioaktivität verschwindet nach Behandlung der gesamten Ribosomen mit RNase weitgehend (Abbildung 4, oberer Teil). Er wird allerdings nicht quantitativ über dem Monosomengipfel wiedergefunden, wie man nach der Umwandlung von Polysomen in Monosomen erwarten sollte. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß unter den Bedingungen des Experiments ein Teil der Amino-acyl-transfer-RNA an den Monosomen abgebaut und entfernt wird.

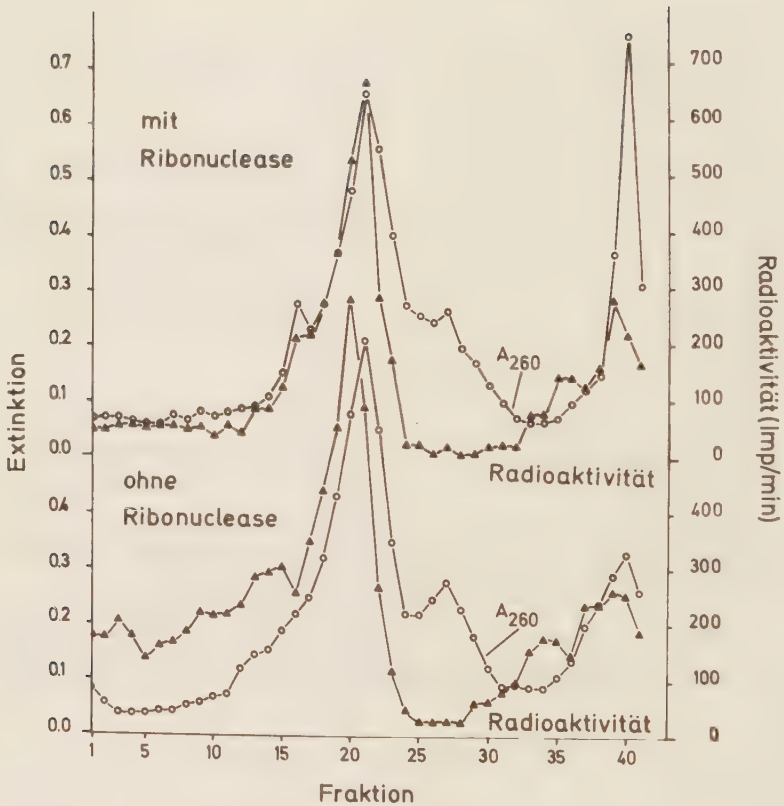


Abbildung 4: Saccharosedichtegradientenzentrifugation von Ribosomen aus in vitro markierten Mitochondrien, von denen ein Anteil mit Ribonuclease behandelt, der andere ohne weitere Behandlung auf den Gradienten aufgetragen wurde.

Aus in vitro markierten Mitochondrien wurden die Ribosomen isoliert. Die Hälfte davon wurde 1 h bei +4°C mit 1 µg/ml Pancreasribonuclease inkubiert. Die andere Hälfte blieb als Kontrolle unbehandelt. Dann folgte die Auftrennung über Saccharosedichtegradienten sowie die Analyse der Gradienten.

#### 4.3. Biosynthese der mitochondrialen ribosomalen Proteine

In drei Parallelexperimenten wurden 18 h alten Hyphen unter verschiedenen Bedingungen radioaktiv markierte Aminosäuren zum Einbau angeboten. In allen drei Fällen wurden die Hyphen im Zuchtmedium mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Leucin, Isoleucin und Phenylalanin versetzt. Nach 20 min wurden die gleichen Aminosäuren in unmarkierter Form in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Dadurch wurde die ursprünglich zugegebene Radioaktivität um etwa den Faktor  $10^4$  verdünnt. Dies wurde getan, um sicher zu sein, daß die mit den Ribosomen assoziierte Radioaktivität tatsächlich neusynthetisierte ribosomale Proteine repräsentiert und nicht anhängende unvollständige Peptidketten. Dieser "Chase" dauerte 20 min; dann wurden die Hyphen geerntet.

Im ersten der drei Experimente, das als Kontrolle diente, wurde diese Versuchsanordnung ohne weitere Änderung verwendet. Im zweiten der drei Parallelexperimente wurde vor der Zugabe der radioaktiven Aminosäuren 10 min mit 0,1 mg/ml Cycloheximid inkubiert. Im dritten Experiment wurde 10 min mit 4 mg/ml D-Chloramphenicol inkubiert, bevor die radioaktiven Aminosäuren zugesetzt wurden. Aus den geernteten Hyphen wurden jeweils die Mitochondrien und aus diesen die Ribosomen isoliert.

Von den einzelnen Stufen der Präparation dieser Parallelversuche wurden die spezifischen Radioaktivitäten bestimmt. Sie sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Im Kontrollexperiment (Tabelle 2, linke Reihe) zeigen alle mitochondrialen Fraktionen (1 - 4) etwa gleichespezifische Radioaktivitäten. Die spezifische Radioaktivität der Zellsaft-Proteine (Cytosol, Fraktion 6) ist etwas geringer. Die spezifische Radioaktivität der cytosolischen (extramitochondrialen) Ribosomen (Fraktion 5) ist annähernd halb so groß wie diejenige der cytosolischen Überstandsproteine. Wahrscheinlich ist dies nicht auf eine geringe Stabilität der Markierung während des "Chase" zurückzuführen. Die spezifische Radioaktivität der cytosolischen Ribosomen zeigte keine wesentlichen Änderungen während der "Chase"-Periode.

Tabelle 2

| Fraktion                                                         | Spezifische Radioaktivitäten (cpm/mg Protein) |                                             |                      |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|
|                                                                  | Kontrolle                                     | Nach Vorinkubation mit<br>Cyclo-<br>heximid | Chlor-<br>amphenicol |
| 1) Lysierte Mitochondrien                                        | 25.010                                        | 2.380                                       | 13.280               |
| 2) Sediment der lysierten Mitochondrien nach 30 min bei 30.000xg | 27.700                                        | 1.460                                       | 10.830               |
| 3) Rohe mitochondriale Ribosomen                                 | 21.100                                        | 750                                         | 10.400               |
| 4) Überstand der mitochondrialen Ribosomen                       | 23.550                                        | 2.800                                       | 12.800               |
| 5) Cytosolische Ribosomen                                        | 8.700                                         | 234                                         | 5.700                |
| 6) Überstand der cytosolischen Ribosomen                         | 17.700                                        | 95                                          | 11.810               |

Tabelle 2: Einfluß von Inhibitoren auf den *in vivo* Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in verschiedene Fraktionen von *Neurospora*-Hyphen.

*Neurospora*-Hyphen wurden nach 18-stündigem Wachstum 20 min mit 14C-l-Leucin, 14C-l-Isoleucin und 14C-l-Phenylalanin (jeweils 6,7 nC/ml) inkubiert. Dann erfolgte ein "Chase" von 20 min mit unmarkierten Aminosäuren (Endkonzentration jeweils 2 mM). Die Inhibitoren (Cycloheximid 0,1 mg/ml und Chloramphenicol 4 mg/ml) wurden 10 min vor Zugabe der radioaktiven Aminosäuren zugesetzt.

Unter der Einwirkung von Cycloheximid (Tabelle 2, mittlere Reihe) verringert sich der Einbau in die cytosolischen Ribosomen (Fraktion 5) und in die Zellsaft-Proteine (Cytosol, Fraktion 6) auf 2,5 % bzw. 0,5 % der Kontrolle. Im Gegensatz dazu beträgt der Einbau in das gesamte mitochondriale Protein (Lysierte Mitochondrien, Fraktion 1) noch ungefähr 10 % der Kontrolle. Der größere Anteil die-

ser Radioaktivität findet sich in der Triton X-100-löslichen Fraktion des Mitochondrienlysats (Überstand, Fraktion 4). Darin beträgt die spezifische Radioaktivität 15 % der Kontrolle. Die Triton-lösliche Fraktion beinhaltet die mitochondrialen Matrix- und Membranproteine zu ungefähr gleichen Anteilen. Da bekannt ist, daß die Matrixproteine durch das mitochondriale System nicht markiert werden (11, 22), kann die spezifische Radioaktivität der mitochondrialen Membranproteine auf 30 % der Kontrolle geschätzt werden. Die Fraktion der ungereinigten mitochondrialen Ribosomen (Fraktion 3) die der nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation unterworfen wurde, weist 3,5 % der spezifischen Radioaktivität der entsprechenden Fraktion im Kontrollexperiment auf.

In dem Experiment mit Chloramphenicol-Vorinkubation läßt sich in allen Fraktionen eine Abnahme der spezifischen Radioaktivität um etwa den gleichen Prozentsatz gegenüber der Kontrolle erkennen. Ähnliche Ergebnisse wurden von KÜNTZEL (27) erhalten.

Die Ergebnisse stellen sich auch hier eindeutiger dar, wenn die rohen Ribosomen über einen Saccharosedichtegradienten weiter gereinigt und aufgetrennt wurden. Dies ist in den Abbildungen 5 - 7 gezeigt.

Im Kontrollexperiment (Abbildung 5) findet vorzugsweise eine Markierung des Monosomengipfels statt. Die Schulter, die den Untereinheiten entspricht, enthält keine Radioaktivität. Nahe dem Auftrag erscheint ein kleiner Teil der Radioaktivität. In der Polysomenregion (Fraktionen 1 - 20), wo die wachsenden Peptidketten zu suchen sind, findet sich nur eine sehr geringe Radioaktivität. Dies zeigt die Wirksamkeit des 20-minütigen "Chase". Alle ribosomalen Fraktionen des Gradienten, mit Ausnahme der Untereinheiten, weisen etwa gleiche spezifische Radioaktivitäten, bezogen auf die Absorption bei 260 nm, auf.

Die mitochondrialen Ribosomen, die aus den mit Cycloheximid vorbehandelten Hyphen stammen (Abbildung 6), weisen keine signifikante Radioaktivität mehr auf. Weder in der Monosomen- noch in der Polysomenregion findet sich Radioaktivität, die die Fehlergrenzen der Nullwertzählung überschreitet.

Im Gegensatz dazu entspricht die Verteilung der Radioaktivität in den Fraktionen des Gradienten des Chloramphenicol-experiments (Abbildung 7) der des Kontrollexperiments. Die spezifischen Radioaktivitäten sind dabei fast gleich groß.

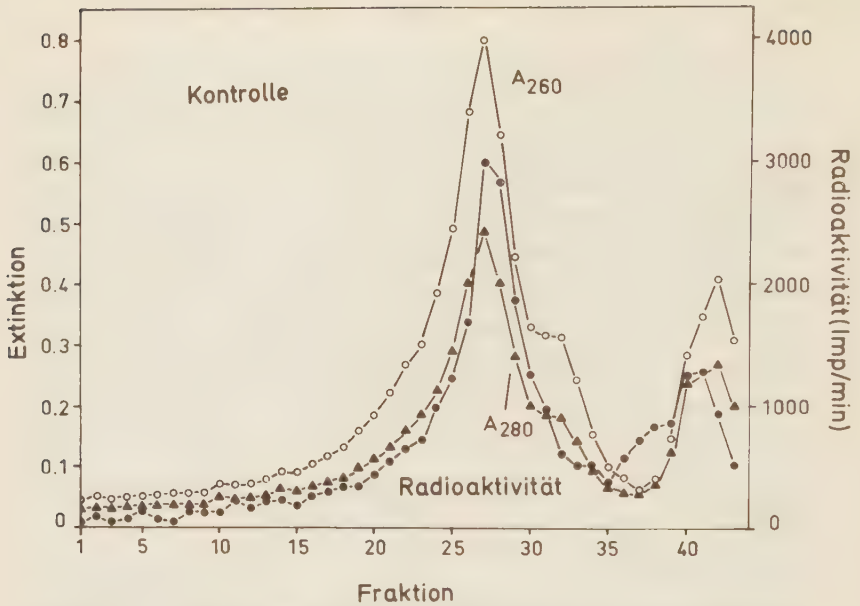


Abbildung 5: Saccharosedichtegradientenzentrifugation der rohen Ribosomenfraktion des Kontrolllexperiments in Tabelle 2.

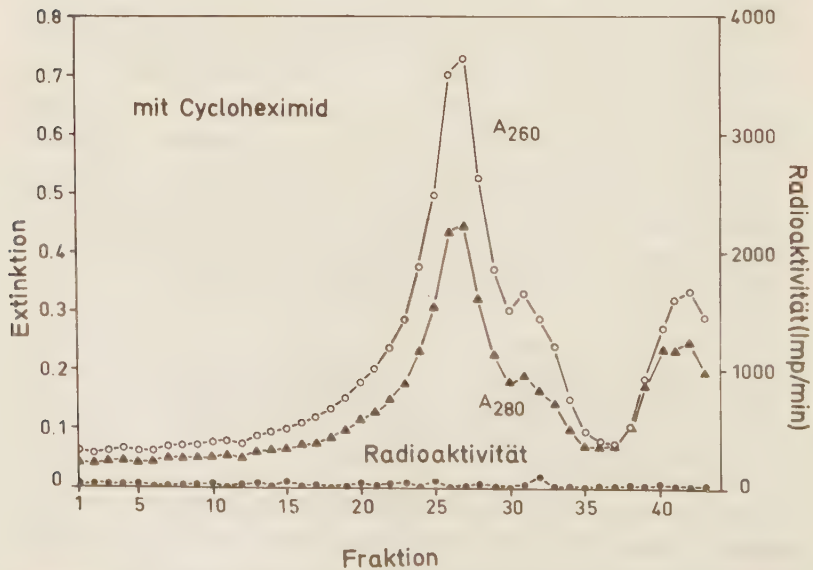


Abbildung 6: Saccharosedichtegradientenzentrifugation der rohen Ribosomenfraktion aus mit Cycloheximid vorbehandelten Hyphen in Tabelle 2.

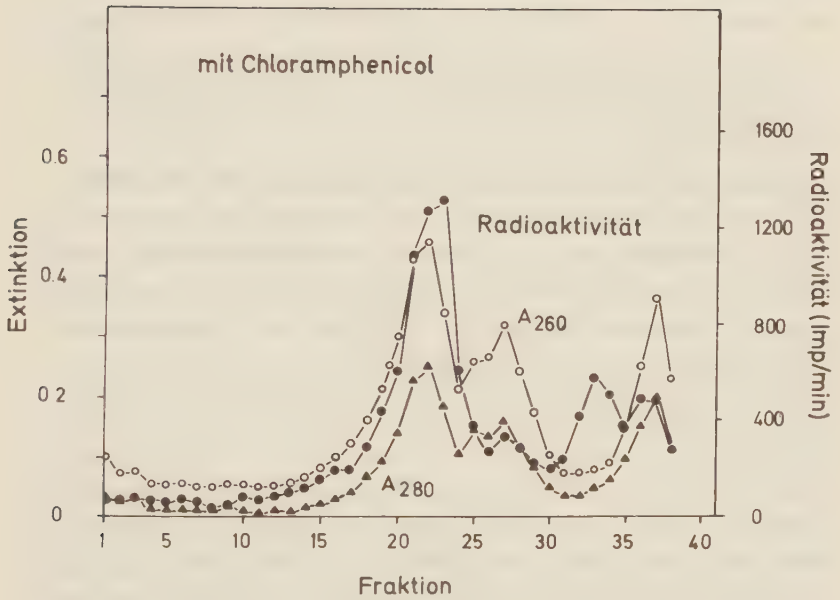


Abbildung 7: Saccharosedichtegradientenzentrifugation der rohen Ribosomenfraktion aus mit Chloramphenicol vorbehandelten Hyphen in Tabelle 2.

## 5. DISKUSSION

In den Experimenten von KÜNTZEL (27), von RIFKIN et al. (2) und von DURE et al. (28) war gezeigt worden, daß sich mitochondriale und cytosolische Ribosomen in zahlreicher Hinsicht unterscheiden: In den Sedimentationskonstanten, im Dissoziationsverhalten, in den elektrophoretischen und chromatographischen Mustern ihrer Proteine, in den Eigenschaften und der Zusammensetzung ihrer Ribonucleinsäuren und in ihrer Empfindlichkeit gegen verschiedene Hemmstoffe der Proteinbiosynthese.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der mitochondrialen Ribosomen und der mitochondrialen ribosomalen RNA bestätigen ihren Unterschied zu den cytosolischen Ribosomen bzw. zu der cytosolischen ribosomalen RNA. Gleichzeitig dient sie dazu, die Reinheit der mitochondrialen Ribosomen in den hier beschriebenen Experimenten nachzuweisen. Es war klar, daß die angestellten Versuche nur dann verlässliche Schlüsse zuließen, wenn die mitochondrialen Ribosomen nicht durch cytosolische Ribosomen oder durch anderes Zellmaterial verunreinigt waren.

Eine sehr sorgfältige Bestimmung der  $S_{20}$ -Werte der Ribosomen war durch KÜNTZEL und NOLL (1) und KÜNTZEL (29) vorgenommen worden. Sie ergaben 77S und 73S für die Monosomen der cytosolischen bzw. mitochondrialen Ribosomen, und für die Untereinheiten 57S/37S bzw. 50S/37S. Die hier durchgeführten Gradientenzentrifugationen erbrachten weitgehend übereinstimmende Werte für die Monosomen. Das Verhalten der Untereinheiten wurde nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den cytosolischen Ribosomen liegen offensichtlich die mitochondrialen Ribosomen in der Zelle zu einem gewissen Prozentsatz, der mit dem Alter der Hyphen ansteigt, in dissoziierter Form vor. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht bekannt.

Die Charakterisierung der mitochondrialen ribosomalen RNA war in den erwähnten Arbeiten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen worden.

Die dabei erhaltenen Werte variieren stark in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, insbesondere den in den Dichtegradienten verwendeten Salzkonzentrationen. Einerseits sind für beide RNA-Spezies der mitochondrialen Ribosomen S-Werte beschrieben worden, die kleiner sind als die jeweils entsprechenden der cytosolischen Ribosomen (28, 29) und denen von bakteriellen Ribosomen ähneln. Andererseits wurden für die RNAs aus beiden Ribosomentypen sehr ähnliche S-Werte gefunden, sogar höhere für die RNA aus der kleineren Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen (2).

In dieser Arbeit wurde zum erstenmal die Polyacrylamidgelelektrophorese zur Charakterisierung der mitochondrialen ribosomalen RNA verwendet. Diese Methode kann zur Bestimmung der Molekulargewichte herangezogen werden (30, 31) und im Gegensatz zu den vorher zitierten Arbeiten (28, 29) ergab sich dabei keine Ähnlichkeit der ribosomalen RNA von *Neurospora*-Mitochondrien mit derjenigen von Bakterien. Dies deutet darauf hin, daß mitochondriale und bakterielle Ribosomen sich zwar in zahlreichen, aber nicht notwendigerweise allen Eigenschaften gleichen.

Von anderen Autoren wurde bis jetzt nie über eine cytosolische ribosomale 5S-RNA berichtet. Dies mag daran liegen, daß diese im Dichtegradienten von der 4S-RNA nicht zu trennen ist. In den hier angestellten Untersuchungen konnte nie eine 5S-RNA in Mitochondrien aufgefunden werden, auch nicht in den cytoplasmatischen Mutanten mi-1 und mi-3 von *Neurospora crassa* (32). Wenn auch nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese RNA-Spezies ganz besonders labil ist und deshalb verloren geht, so soll doch darauf hingewiesen werden, daß auch in den mitochondrialen ribosomalen RNAs aus anderen Organismen wie *Xenopus* (33) und *Locusta migratoria* (34) keine 5S-RNA entdeckt wurde. Eventuell weist das auf ein besonderes Bauprinzip der mitochondrialen Ribosomen hin.

Die Summe der hier beschriebenen Beobachtungen aus Gradientenzentrifugation und Gelelektrophorese läßt den Schluß zu, daß die verwendeten mitochondrialen Ribosomen zu weniger als 5 % mit cytosolischen Ribosomen verunreinigt sind. Demnach sind die im folgenden berichteten Ergebnisse charakteristisch für das mitochondriale System.

Die Experimente mit den isolierten Mitochondrien wurden angestellt, um zu erfahren, ob die mitochondrialen Ribosomen Polypeptidketten synthetisieren können. Nach dem Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte und gereinigte Mitochondrien haben die mitochondrialen Ribosomen eine höhere spezifische Radioaktivität als die gesamten Mitochondrien, besonders in den Fraktionen, in denen Polysomen zu finden sind. Die Markierung kann von den Ribosomen durch Inkubation der Mitochondrien mit Puromycin entfernt werden. Daraus kann geschlossen werden, daß die mitochondrialen Ribosomen Aminosäuren in Polypeptidketten einbauen und weiter, daß wenigstens ein Teil der Ribosomen in Form von Polysomen aktiv ist. Dies bestätigt und erweitert Ergebnisse von KÜNTZEL (35). Er zeigte, daß ein poly-U abhängiger Aminosäureeinbau in isolierte Ribosomen aus *Neurospora*-Mitochondrien erfolgt. Wahrscheinlich ist auch die Radioaktivität über dem Monosomengipfel auf durch endogene Ribonuclease zerstörte Polysomen zurückzuführen. Einerseits schwankt in verschiedenen Experimenten die Verteilung der Radioaktivität über Monosomen und Polysomen stark, andererseits ist die häufig beobachtete Zerstörung der ribosomalen RNA-Spezies in kleinere Stücke bei langsamen Arbeiten ein deutliches Zeichen für die Anwesenheit einer sehr starken Nucleaseaktivität in den isolierten Mitochondrien. Einen weiteren Beweis für die Existenz von Polysomen liefert die Beobachtung, daß die Radioaktivität über der Polysomengegend durch Einwirkung von Ribonuclease in geringen Konzentrationen auf isolierte Ribosomen entfernt werden kann.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß im wesentlichen die Polypeptidketten von Polysomen synthetisiert werden, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch Monosomen aktiv sind. Weniger als 10 % der gesamten eingebauten Radioaktivität findet sich in unvollständigen Peptidketten an den mitochondrialen Ribosomen in den hier beschriebenen Experimenten. Die anderen 90 % werden in der unlöslichen Membranfraktion gefunden, die bei Proteingelektrophorese definierte und charakteristische Radioaktivitätsbanden ergaben. Offensichtlich findet in dem *in vitro* System eine Synthese von Polypeptiden mit definierter Kettenlänge statt, die von den Ribosomen abgelöst werden.

Unter nicht optimalen Bedingungen für den Einbau der radioaktiven Aminosäuren in die isolierten Mitochondrien ist die Verteilung der eingebauten Radioaktivität zwischen Ribosomen und Membranproteinen anders. In einem Experiment, in dem der Einbau in ganze Mitochondrien um den Faktor 12,5 geringer war, verglichen mit dem Experiment in Tabelle 1, war die spezifische Radioaktivität der rohen Ribosomen um den Faktor 7,5 höher als die der ganzen Mitochondrien. Etwa 25 % der gesamten eingebauten Radioaktivität fanden sich in diesem Fall an den Ribosomen. Diese Beobachtung ist für die Untersuchungen zur Charakterisierung des Syntheseproduktes der mitochondrialen Ribosomen von Bedeutung. Sie weist darauf hin, daß jedes *in vitro* Einbausystem daraufhin kontrolliert werden muß, ob ein vernünftiger Anteil der eingebauten Aminosäuren in Form von fertigen, von den Ribosomen abgelösten Peptidketten vorliegt.

Nach Ablösung der Polypeptidketten von den mitochondrialen Ribosomen bleibt keine Radioaktivität in dem ribosomalen Protein zurück. Daraus kann gefolgert werden, daß isolierte Mitochondrien keine signifikanten Mengen ihrer ribosomalen Proteine synthetisieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß mitochondriale ribosomale Proteine zwar vom mitochondrialen System synthetisiert werden, unter den vorliegenden *in vitro* Bedingungen aber nicht in die ribosomale Struktur integriert werden. Zum Beispiel ist mit Sicherheit unter den hier angewendeten Einbaubedingungen die Synthese von ribosomaler RNA weitgehend unterbunden.

Demnach ist das *in vitro* System nur unzureichend zur Beantwortung der Frage nach dem Syntheseort der mitochondrialen ribosomalen Proteine geeignet. Deshalb wurde die spezifische Wirkung von Hemmern der cytosolischen bzw. mitochondrialen Proteinsynthese in intakten Zellen ausgenutzt, um diesem Problem nachzugehen.

Dabei ergab sich, daß die Biosynthese der mitochondrialen ribosomalen Proteine durch Cycloheximid, einem spezifischen Inhibitor der extramitochondrialen, cytosolischen Proteinbiosynthese (10, 11) gehemmt werden kann, aber nicht durch Chloramphenicol, das spezifisch den mitochondrialen Aminosäureeinbau hemmt (12, 13, 14). Diese Ergebnisse legen dar, daß die Synthese der mitochondrialen

ribosomalen Proteine abhängig ist vom Funktionieren der cytosolischen Proteinsynthese, aber nicht von dem des mitochondrialen Aminosäureeinbaus.

Die äußerst starke Hemmung durch Cycloheximid legt als wahrscheinlichste Erklärung dafür nahe, daß die überwiegende Mehrheit, wenn nicht alle mitochondrialen ribosomalen Proteine vom cytosolischen System synthetisiert werden. Natürlich schließen diese Experimente nicht aus, daß ein geringer Anteil dieser Proteine, einige wenige von 40 oder 50 (27) vom mitochondrialen System gebildet werden.

Diese Schlußfolgerungen implizieren eine Kooperation von mitochondrialen und cytosolischen Biosynthesystemen bei der Biogenese der mitochondrialen Ribosomen. Es ist gezeigt worden, daß die mitochondriale ribosomale RNA auf der mitochondrialen DNA codiert ist und innerhalb der Mitochondrien synthetisiert wird (6, 7, 8, 9).

Andere, weniger wahrscheinlichere Interpretationen unserer Ergebnisse sollen im folgenden diskutiert werden:

Es könnte sein, daß nur eines oder ein paar Proteine, die für die Bildung der mitochondrialen Ribosomen notwendig sind, durch das Cycloheximid-sensitive System synthetisiert werden. Diese Erklärung schließt ein, daß die durchschnittliche Zeit zwischen der Synthese dieser Komponente(n) und ihrer Integration in die mitochondrialen Ribosomen viel kürzer als 10 min ist. Mit anderen Worten, nur ein kleiner Teil dieser Komponenten würde in der Zelle in einem freien Zustand existieren, der noch nicht in die Ribosomen integriert ist, sodaß der "Pool" des Vorläufer-Proteins nach 10-minütiger Inkubation mit Cycloheximid erschöpft ist.

Eine zweite denkbare Möglichkeit wäre, daß die mitochondrialen ribosomalen Proteine alle mitochondrialen Ursprungs wären, daß aber ein "Auslöser"-Protein existierte, das an den cytosolischen Ribosomen synthetisiert würde und dann in die Mitochondrien transportiert würde, um dort spezifisch die Synthese der mitochondrialen Ribosomen oder eine ihrer Komponenten zu regulieren. Aus dem gleichen Grund wie oben erwähnt, müßte dieses Protein eine extrem kleine Halbwertszeit besitzen; das heißt, es müßte innerhalb von weniger als 10 min zerstört werden. Solch ein hoher Turnover erscheint für ein Protein sehr unwahrscheinlich.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mitochondriale und cytosolische Ribosomen wurden aus *Neurospora crassa* isoliert und durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation charakterisiert. Sie unterscheiden sich in den Sedimentationskonstanten ihrer Monosomen und können ohne gegenseitige Kontamination erhalten werden.
2. RNA aus mitochondrialen und cytosolischen Ribosomen wurden mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert. Die RNA aus den großen Untereinheiten beider Ribosomentypen haben gleich große Molekulargewichte, die RNA aus der kleinen mitochondrialen Untereinheit ein größeres als das der entsprechenden cytosolischen. Aus den mitochondrialen Ribosomen konnte keine 5S-RNA isoliert werden.
3. Radioaktive Aminosäuren wurden in isolierte Mitochondrien eingebaut. Nach Isolierung und Dichtegradientenzentrifugation der mitochondrialen Ribosomen wurde eine vorzugsweise Markierung der Polysomen beobachtet. Wenn die Mitochondrien nach dem Einbau der radioaktiven Aminosäuren mit Puromycin behandelt wurden, konnte weder an den Monosomen noch an den Polysomen Radioaktivität gefunden werden. Es wird geschlossen, daß Ribosomen in isolierten Mitochondrien Polypeptidketten synthetisieren. Sie bauen keine signifikanten Mengen an Aminosäuren in die mitochondrialen ribosomalen Proteine ein.
4. Radioaktive Aminosäuren wurden *in vivo* in *Neurospora crassa*-Zellen eingebaut, aus denen dann die mitochondrialen Ribosomen isoliert wurden. Der Einbau der Radioaktivität in die Proteine dieser Ribosomen wurde durch Cycloheximid, aber nicht durch Chloramphenicol gehemmt. Es wird daher geschlossen, daß die Proteine der mitochondrialen Ribosomen an den Cycloheximid-sensitiven und Chloramphenicol-insensitiven cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden.

## 7. ABKÜRZUNGEN

|                           |                                                                                                                                                                        |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IM                        | <p>Isolierungs-Medium:</p> <p>0,44 M Saccharose</p> <p>10 mM Tris-HCl</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>pH 7,2</p>                                                               |
| AMT <sub>10</sub>         | <p>100 mM Ammoniumchlorid</p> <p>30 mM Magnesiumchlorid</p> <p>10 mM Tris-HCl</p> <p>pH 7,6</p>                                                                        |
| AMT <sub>30</sub>         | <p>100 mM Ammoniumchlorid</p> <p>30 mM Magnesiumchlorid</p> <p>30 mM Tris-HCl</p> <p>pH 7,6</p>                                                                        |
| A <sub>260</sub> -Einheit | <p>diejenige Menge einer Substanz, die in 1 ml einer Lösung enthalten ist und bei 260 nm und einem Lichtweg von 1 cm in der Kuvette eine Extinktion von 1 aufweist</p> |
| RNA                       | Ribonucleinsäure                                                                                                                                                       |
| DNA                       | Desoxyribonucleinsäure                                                                                                                                                 |
| TCA                       | Trichloressigsäure                                                                                                                                                     |
| cpm                       | Zählimpulse pro min                                                                                                                                                    |

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 KÜNTZEL, H. and H. NOLL  
Nature, 215 (1967) 1340
- 2 RIFKIN, M. R., D. D. WOOD and D. J. L. LUCK  
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 58 (1967) 1025
- 3 SCHATZ, G.  
in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts", E. Racker,  
editor, Van Nostrand Reinhold Co., New York (1970) 251
- 4 NEUPERT, W., D. BRDICZKA und TH. BÜCHER  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 27 (1967) 488
- 5 NEUPERT, W.  
Dissertation, Universität München (1970)
- 6 WOOD, D. D. and D. J. L. LUCK  
J. Mol. Biol., 41 (1969) 211
- 7 WINTERSBERGER, E.  
Hoppe Seyler's Zschr. f. Physiol. Chemie, 348 (1967) 1701
- 8 FUKUHARA, H.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 58 (1967) 1065
- 9 SUYAMA, Y.  
Biochemistry, 6 (1967) 2829
- 10 BEATTIE, D. S.  
J. Biol. Chem., 243 (1968) 4027
- 11 SEBALD, W., A. SCHWAB and TH. BÜCHER  
in "Inhibitors Tools in Cell Research", Th. Bücher and H. Sies,  
editors Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)  
140

- 12 WINTERSBERGER, E.  
Biochem. Z., 341 (1964) 409
- 13 CLARK-WALKER, D.G. and A.W. LINNANE  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 25 (1966) 8
- 14 SO, A.G. and E.W. DAVIE  
Biochemistry, 2 (1963) 132
- 15 SEBALD, W.  
Dissertation, Universität München (1969)
- 16 VOGEL, H. J.  
Microbial Genet. Bull., 13 (1956) 42
- 17 LUCK, D. J. L.  
J. Cell Biol., 16 (1963) 483
- 18 WEISS, H., G.v. JAGOW, M. KLINGENBERG and TH. BÜCHER  
Europ. J. Biochem., 14 (1970) 75
- 19 NOLL, H.  
Nature, 215 (1967) 360
- 20 PEACOCK, A. C. and C. W. DINGMAN  
Biochemistry, 6 (1967) 1818
- 21 DINGMAN, C. W. and A. C. PEACOCK  
Biochemistry, 7 (1968) 659
- 22 SEBALD, W., TH. BÜCHER, B. OLBRICH and F. KAUDEWITZ  
FEBS Letters, 1 (1968) 235
- 23 BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK,  
K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER  
Z. Naturforschung, 8b (1953) 555
- 24 LOWRY, H. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL  
J. Biol. Chem., 193 (1951) 265

- 25 VOLKIN, E. and W.E. COHN  
Meth. biochem. Anal., 1 (1954) 287
- 26 RICH, A., J.R. WARNER and H.M. GOODMAN  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXVIII,  
New York (1963) 269
- 27 KÜNTZEL, H.  
Nature, 222 (1969) 142
- 28 DURE, L.S., J.L. EPLER and E. BARNETT  
Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 58 (1967) 1883
- 29 KÜNTZEL, H.  
J. Mol. Biol., 40 (1969) 315
- 30 PEACOCK, A.C. and C.W. DINGMAN  
Biochemistry, 7 (1968) 668
- 31 LOENING, U.E.  
J. Mol. Biol., 38 (1968) 355
- 32 NEUPERT, W., P. MASSINGER and A. PFALLER  
in "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts"  
edited by N.K. Bordman, A.W. Linnane and R.M. Smillie,  
North Holland Publishing Co., Amsterdam (1970) im Druck
- 33 SWANSON, R.F. and I.B. DAVID  
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 66 (1970) 117
- 34 KLEINOW, W. und W. NEUPERT  
Hoppe Seyler's Zschr. f. Physiol. Chemie, im Druck
- 35 KÜNTZEL, H.  
FEBS Letters, 4 (1969) 140



Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Th. Bücher, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die Großzügigkeit, unter seiner Leitung arbeiten zu dürfen.

Herrn Dipl. Chem. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert bin ich zu größtem Dank für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seine stets tatkräftige Unterstützung verpflichtet.

Herrn Adolph Pfaller bin ich für alle seine Hilfe besonders dankbar.

## Lebenslauf

Am 4. Juni 1941 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Georg Massinger und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene Lechner, in München geboren.

Im September 1947 trat ich in die Volksschule ein; ab 1952 besuchte ich die Rupprecht-Oberrealschule in München, an der ich im Juli 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und bestand am 19. Dezember 1968 das medizinische Staatsexamen. Schon während der klinischen Semester arbeitete ich - mit größeren Unterbrechungen - am Institut für Physiologische Chemie, an dem ich vom 1. Januar 1969 bis 31. Dezember 1969 eine Medizinalassistentenstelle innehatte. In der Arbeitsgruppe Dr. Neupert war ich an vorliegender Arbeit tätig.

Nach Ableistung der vorgeschriebenen Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 1. September 1970 die Approbation.







